



10/10/84

RECEIVED

OCT 2 1984

GROUP 10 #4

IN THE UNITED STATES PATENT & TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application

HADVARY ET AL.

Serial No. 621,827, filed June 18, 1984

For: LEUCINE DERIVATIVES

12 x
11/5/84
Milestone

CLAIM FOR RIGHT OF PRIORITY

Nutley, New Jersey 07110

October 8, 1984

Honorable Commissioner of Patents & Trademarks

Washington, D.C. 20231

S i r:

Under the provisions of 35 U.S.C. (1952) 119 and Rule 55, the benefit of priority of the filing date of prior foreign application(s) listed below is claimed for the present U.S. application.

<u>No.</u>	<u>Filing Date</u>	<u>Country</u>
3415/83	June 22, 1983	Switzerland

The Declaration of the present U.S. application contains a recitation of the foreign application(s) listed above.

A certified copy of each foreign application listed above is attached hereto.

Respectfully submitted,


Attorney for Applicant(s)

George W. Johnston (Reg.No. 28090)
340 Kingsland Street
Nutley, New Jersey 07110
Phone: 201 - 235-3656

GWJ/av
Enc.

Hoffman-La Roche



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT CONFÉDÉRATION SUISSE CONFEDERAZIONE SVIZZERA

Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen überein mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein. *

Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein * spécifiée à la page suivante.

Attestazione

Gli uniti documenti sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein * specificata nella pagina seguente.

Bern, 12. April 1984

Bundesamt für geistiges Eigentum
Office fédéral de la propriété intellectuelle
Ufficio federale della proprietà intellettuale

Der Sektionschef / Le chef de section / Il capo di sezione


Blaser

* Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

* La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

* La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

Voraussichtliche Klasse(n): C07D/C12P/A61K

Patentgesuch Nr. 3 415/83-4

Patent-
bewerber: F. Hoffmann-La Roche
& Co. Aktiengesellschaft
Grenzacherstrasse 124-184
4002 Basel
Schweiz

Titel: Leucinderivate.

Datum der
Anmeldung: 22.06.83

Priorität: -

Referenz: RAN 4039/42

F.Hoffmann-La Roche & Co.Aktiengesellschaft, Basel/Schweiz

RAN 4039/42

5

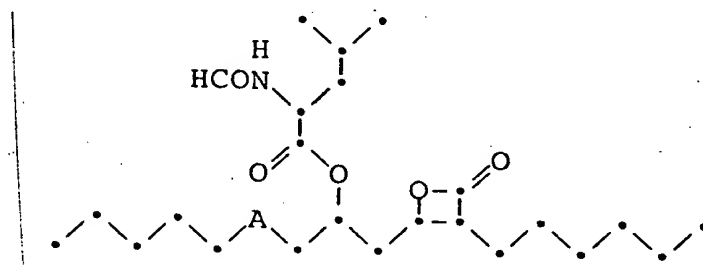
10

Leucinderivate

15

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel

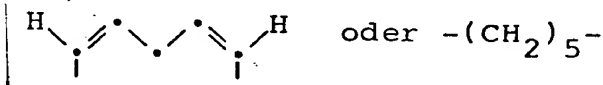
20



I

25

worin A die Gruppe

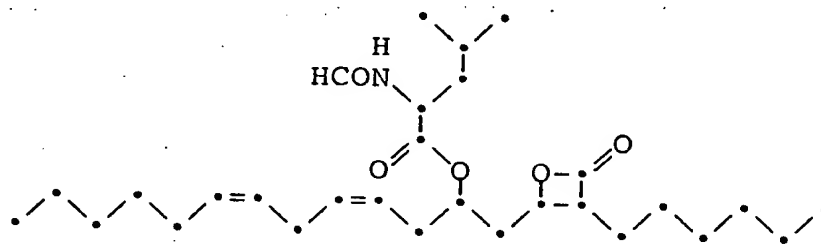


oder $-(CH_2)_5-$

bedeutet.

Die obige Formel I umfasst N-Formylleucin 1-[(3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl)methyl]-3Z,6Z-dodecadienyl-ester der Formel

30

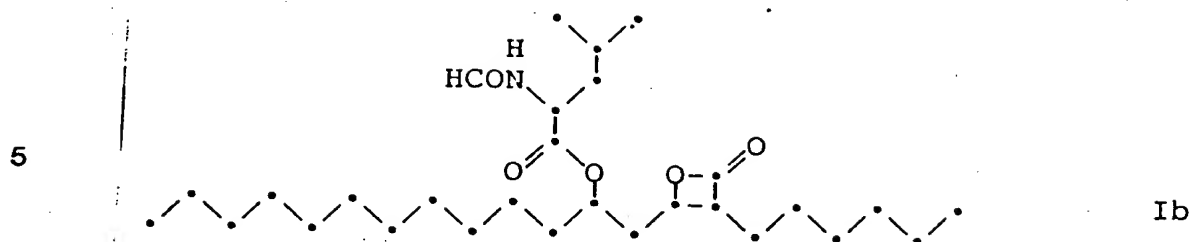


Ia

35

welcher nachstehend als Lipstatin bezeichnet wird, und N-Formylleucin 1-[(3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl)methyl]dodecanyl-

ester der Formel



welcher nachstehend als Tetrahydrolipstatin bezeichnet wird.

10 Diese Verbindungen sind neu und besitzen wertvolle pharmakologische Eigenschaften. Sie hemmen insbesondere die Pankreaslipase und können bei der Bekämpfung oder Verhütung von Obesitas und Hyperlipämien verwendet werden.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die Verbindungen der obigen Formel I als solche und als pharmazeutische Wirkstoffe, die Herstellung dieser Verbindungen, Arzneimittel und industriell gefertigte Lebensmittel, enthaltend eine Verbindung der Formel I, deren Herstellung, 20 sowie die Verwendung dieser Verbindungen bei der Bekämpfung oder Verhütung von Krankheiten.

Die Verdauung der mit der Nahrung aufgenommenen Fette (Triglyceride) erfolgt im Darm durch die Pankreaslipase. 25 Die Pankreaslipase spaltet die primären Esterbindungen von Triglyceriden, wobei als Produkte freie Fettsäuren und 2-Monoglyceride entstehen. Diese Produkte können dann resorbiert und verwertet werden. Durch die Hemmung der Pankreaslipase wird die erwähnte Spaltung der Nahrungs- 30 fette und damit auch die Resorption und Verwertung dieser Stoffe teilweise verhindert; die Triglyceride werden unverändert ausgeschieden.

Die Hemmung der Pankreaslipase durch die Verbindungen 35 der Formel I kann experimentell gezeigt werden, indem man die bei der Spaltung von Triolein durch Schweinepankreaslipase freigesetzte Oelsäure titrimetrisch erfasst. Zu einer Emulsion, welche 1 mM Taurodeoxycholat, 9 mM Tauro-

deoleat, 0,1 mM Cholesterin, 1 mM Eilezithin, 15 mg/ml BSA, 2 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumchlorid, 1 mM Calciumchlorid und das Substrat Triolein enthält, gibt man die in Aethanol oder Dimethylsulfoxid (10% des Emulsionsvolumens) gelöste Verbindung der Formel I und startet die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l (175 U) Schweinepankreaslipase. Der pH wird während der Reaktion durch Zugabe von Natronlauge bei 8 gehalten. Aus dem während 10 Minuten ermittelten Verbrauch an Natronlauge wird die IC_{50} berechnet. Die IC_{50} ist diejenige Konzentration, bei der die Lipaseaktivität halbmaximal gehemmt wird. Die nachfolgende Tabelle I enthält die für die Verbindungen der Formel I ermittelten IC_{50} -Werte und Angaben über die akute Toxizität (DL_{50} nach einmaliger oraler Verabreichung an Mäusen).

Tabelle I

20	Testverbindung	IC_{50} in μ g/ml	DL_{50} in mg/kg p.o.
	Lipstatin	0,07	>4000
	Tetrahydrolipstatin	0,18	-

Die Hemmung der Resorption der mit der Nahrung aufgenommenen Fette, welche durch die Hemmung der Pankreaslipase bewirkt wird, kann in einem Doppelmarkierungs-Experiment an Mäusen gezeigt werden. Zu diesem Zweck verabreicht man den Versuchstieren eine Testmahlzeit, welche 3H -Triolein und ^{14}C -Oelsäure enthält, und eine Verbindung der Formel I. Durch Messung der Radioaktivität ermittelt man dann die mit dem Kot ausgeschiedene Menge an 3H -Triolein und ^{14}C -Oelsäure (in % der verabreichten Menge). Die in der nachfolgenden Tabelle II aufgeführten Resultate zeigen, dass im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren die Ausscheidung von unverändertem Triglycerid stark erhöht und die Ausscheidung von Oelsäure weitgehend unver-

ändert ist.

Tabelle II

5

Testver- bindung	Anzahl Versuchs- tiere	Dosis	Ausscheidung in % der verabreichten Menge	
			Triolein	Oelsäure
10 Kontrolle Lipstatin	12	-	3,5 \pm 0,3	10,1 \pm 0,6
	6	40 mg/kg *	56,8 \pm 13	13,8 \pm 5,6

* Die Versuche wurden mit einem Präparat durchgeführt, das
15 etwa 10% Lipstatin enthält. Die angegebene Dosis ist die
verabreichte Menge an Lipstatin.

Die Verbindungen der Formel I können erfindungsgemäss
hergestellt werden, indem man

20

a) zur Herstellung der Verbindung der Formel Ia einen
diese Verbindung produzierenden Microorganismus der Spezies
Streptomyces toxytricini in einem wässrigen Kulturmedium,
das geeignete Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und an-
25 organische Salze enthält, aerob kultiviert und die pro-
duzierte Verbindung der Formel Ia aus der Kulturbrühe ab-
trennt, oder

b) zur Herstellung der Verbindung der Formel Ib die Ver-
30 bindung der Formel Ia hydriert.

Aus Bodenproben von verschiedenen Orten konnten Strepto-
mycetenstämme isoliert werden, welche Lipstatin, die
Verbindung der Formel Ia, produzieren. Als Beispiel sei
35 der aus einer in Spanien gefundenen Bodenprobe isolierte
Microorganismus genannt, der die Laborbezeichnung Strepto-
myces sp. 85-13 erhielt. Die Identifikation dieses Stammes
ergab, dass er zur Gruppe der Streptomyces toxytricini

34.15.83

gehört (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition, Seite 811), und er erhielt die neue Bezeichnung *Streptomyces toxytricini* 85-13. Eine lyophilisierte Probe dieses Stammes wurde am 14. Juni 1983 bei der Agricultural Research Culture Collection, Peoria, Illinois, unter der Bezeichnung NRRL 15443 hinterlegt.

Für den vorliegenden Zweck sind alle Streptomycetenstämme geeignet, die den Lipasehemmer Lipstatin produzieren, insbesondere *Streptomyces toxytricini* 85-13, NRRL 15443, und dessen Subkulturen, Mutanten und Varianten.

Die Kultivierung dieser Microorganismen zur Herstellung von Lipstatin kann nach verschiedenen Fermentationsmethoden durchgeführt werden. Sie kann beispielsweise im Schüttelkolben oder in 10 l- oder 200 l- und 1000 l-Fermentern durchgeführt werden. Eine gewisse Menge Sporenmaterial oder Mycelium eines Lipstatin produzierenden Stammes wird in ein flüssiges Medium gebracht, das geeignete Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und die für das Wachstum notwendigen Salze enthält, und bei einer Temperatur von 20-37°C während 1-6 Tagen aerob bebrütet. Als Kohlenstoffquellen eignen sich beispielsweise Dextrin, Glucose, Stärke, Ribose und Glycerin. Geeignete Stickstoffquellen sind beispielsweise Hefeextrakt, Pepton oder Sojamehl. Als Salze kommen vorzugsweise Ammonium-, Magnesium- und Calciumsalze in Frage. Die Fermentation wird bei pH 6-8 durchgeführt.

Die Isolierung des Lipstatins erfolgt nach an sich bekannten und jedem Fachmann geläufigen Methoden und kann beispielsweise wie folgt durchgeführt werden:

Man zentrifugiert nach Beendigung der Fermentation die Gärbrühe, wonach 60-90% der Aktivität in der Zellmasse und der Rest im Zentrifugat gefunden werden. Die Zellmasse kann dann mit einem niederen Alkohol, wie Metha-

nol und Aethanol, behandelt und mit dem gleichen Lösungsmittel extrahiert werden. Das Zentrifugat kann mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel, z.B. mit Methylenchlorid oder Essigester, extrahiert werden. Das aus den
5 Extrakten gewonnene Material enthält das gewünschte Lipstatin und kann mittels chromatographischer Methoden angereichert und gereinigt werden. Geeignete Methoden sind beispielsweise die multiplikative Extraktion mit dem System Hexan/Methanol/Wasser (50:40:9), die Filtrations-
10 chromatographie über Kieselgel unter Eluieren mit Chloroform, die Säulenchromatographie an Kieselgel unter Eluieren mit Hexan, Essigester und Mischungen davon, die Chromatographie an unpolaren Trägermaterialien unter Eluieren mit polaren Lösungsmitteln, wie Methanol (Reversed-Phase-
15 Chromatographie) und die Hockdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.

Die weiter unten folgenden Beispiele enthalten detaillierte Angaben betreffend die Kultivierung von Streptomyces toxytricini 85-13 und die Isolierung des Lipstatins.
20

Tetrahydrolipstatin, die Verbindung der Formel Ib, kann hergestellt werden, indem man Lipstatin in Gegenwart eines geeigneten Katalysators hydriert. Als Katalysatoren
25 kommen beispielsweise Palladium/Kohle, Platinoxid, Palladium und dergleichen in Frage. Geeignete Lösungsmittel sind beispielsweise niedere Alkohole, wie Methanol und Aethanol. Man arbeitet vorzugsweise bei niedrigen Wasserstoffdrucken und bei Raumtemperatur.

30

Die Verbindungen der Formel I können als Heilmittel, z.B. in Form pharmazeutischer Präparate, Verwendung finden. Die pharmazeutischen Präparate können oral, z.B. in Form von Tabletten, Lacktabletten, Dragées, Hart- und Weich-
35 gelatine kapseln, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen, verabreicht werden.

Zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten können die erfindungsgemässen Produkte mit pharmazeutisch inerten, anorganischen oder organischen Trägern verarbeitet werden. Als solche Träger kann man für Tabletten, 5 Lacktabletten, Dragées und Hartgelatine kapseln beispielsweise Lactose, Maisstärke oder Derivate davon, Talk, Stearinsäure oder deren Salze und dergleichen verwenden. Für Weichgelatine kapseln eignen sich als Träger beispielsweise pflanzliche Öle, Wachse, Fette, halb feste und 10 flüssige Polyole und dergleichen; je nach Beschaffenheit des Wirkstoffes sind jedoch bei Weichgelatine kapseln überhaupt keine Träger erforderlich. Zur Herstellung von Lösungen und Siurpen eignen sich als Träger beispielsweise Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker, Glukose und 15 dergleichen.

Die pharmazeutischen Präparate können daneben noch Konservierungsmittel, Lösungsvermittler, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgiermittel, Süßmittel, Färbemittel, Aromatisierungsmittel, Salze, zur Veränderung des 20 osmotischen Druckes, Puffer, Ueberzugsmittel oder Antioxidantien enthalten. Sie können auch noch andere therapeutisch wertvolle Stoffe enthalten.

25 Wie eingangs erwähnt sind Arzneimittel, enthaltend eine Verbindung der Formel I, ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung, weiterhin auch ein Verfahren zur Herstellung solcher Arzneimittel, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel I und 30 gegebenenfalls einen oder mehrere andere therapeutisch wertvolle Stoffe in eine galenische Darreichungsform bringt. Wie eingangs erwähnt, können die Verbindungen der Formel I bei der Bekämpfung oder Verhütung von Krankheiten verwendet werden und zwar insbesondere bei der 35 Bekämpfung oder Verhütung von Obesitas und Hyperlipämien. Die Dosierung kann innerhalb weiter Grenzen variieren und ist natürlich in jedem einzelnen Fall den individuellen Gegebenheiten anzupassen. Im allgemeinen dürfte bei oraler

Verabreichung eine Tagesdosis von etwa 0,1 mg bis 100 mg/kg Körpergewicht angemessen sein.

Die Verbindungen der Formel I können auch industriell
5 gefertigten Lebensmitteln zugegeben werden, wobei insbesondere Fette, Oele, Butter, Margarine, Schokolade und andere Konfektartikel in Frage kommen. Solche industriell gefertigte Lebensmittel und deren Herstellung sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

10

Die nachfolgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung näher erläutern, ihren Umfang jedoch in keiner Weise beschränken. Sämtliche Temperaturen sind in Celsius-graden angegeben.

15

20

25

30

35

Beispiel 1

a) Fermentation:

Ein Schüttelkolben mit dem Vorkulturmedium 391 wird
5 mit Sporen von *Streptomyces toxytricini* 85-13 (oder vegetativem Mycel davon) beimpft und 72 Stunden bei 28°C als Schüttelkultur aerob bebrütet. Etwa 2-5 Vol.-% dieser Kultur wird verwendet, um eine Fermentervorkultur von 10 l mit Vorkulturmedium 391 zu beimpfen. Man inkubiert während
10 3 Tagen bei 28°, wobei man mit 1 vvm belüftet und bei 400 RPM rührt. Diese 10 l-Vorkultur wird verwendet um einen 200-l-Produktionsfermenter mit dem Produktionsmedium N7 zu beimpfen. Man fermentiert während 124 Stunden bei 28°, wobei man mit 1,0 vvm belüftet und bei 150
15 RPM rührt. Regelmässige Analysen zeigen nach 124 Stunden eine extrazelluläre lipasehemmende Aktivität von 53 IC₅₀/ml.

Das Vorkulturmedium 391 (pH 7,0) hat folgende Zusammensetzung: 3% Maisstärke, 4% Dextrin, 3% Sojamehl,
20 0,2% (NH₄)₂SO₄, 0,6% CaCO₃ und 0,8% Sojaöl. Der pH wurde auf 7 gestellt. Das Produktionsmedium N 7 (pH 7,0) hat folgende Zusammensetzung: 1% Kartoffelstärke, 0,5% Glucose, 1% Ribose, 0,5% Glycerin, 0,2% Pepton, 2% Sojamehl und 0,2% (NH₄)₂SO₄.

25

b) Aufarbeitung:

Man zentrifugiert die Gärbrühe mittels einer Röhrenzentrifuge, wobei man 175 l Kulturfiltrat und 12 kg Mycel erhält. Das Mycel wird verworfen, und das Kulturfiltrat
30 wird während 10 Minuten auf 80° erhitzt, abgekühlt, nochmals zentrifugiert und bei 30° im Vakuum auf 50 l konzentriert. Man extrahiert dieses Konzentrat mit 50 l Hexan mittels eines kontinuierlich arbeitenden Extraktors, mischt die erhaltene Emulsion mit 50 l Hexan/Essigester (1:1) und
35 trennt die organische Phase ab. Diese wird über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft; man erhält 199 g Rohextrakt I. Die wässrige Phase wird mit Wasser auf 100 l verdünnt und mit 100 l Essigester extrahiert. Man erhält

nach dem Eindampfen der Essigesterlösung 49 g Rohextrakt II. Die wässrige Phase wird anschliessend ein weiteres Mal mit 100 l Essigester extrahiert, wobei nach dem Eindampfen 78 g Rohextrakt III erhalten werden.

5

c) Reinigung:

Die Rohextrakte II und III werden in drei Portionen über je 1 kg Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm Korngrösse) filtriert, wobei man mit Chloroform eluiert (Säule: 10 10 x 100 cm). Man erhält auf diese Weise 18,3 g angereichertes Material. 178 g dieser Substanz werden erneut unter Eluieren mit Chloroform über 1 kg Kieselgel filtriert. Man erhält dabei 5,29 g aktives Material. 802 mg dieser Substanz werden mittels Reversed-Phase-Chromato- 15 graphie an einer im Handel erhältlichen Lobar-Fertigsäule (Lichoprep RP-8, Grösse C) unter Eluieren mit Methanol gereinigt. Man erhält 158 mg N-Formylleucin 1-[(3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl)methyl]-3Z,6Z-dodecadienyl-ester (Lipsta- tin), das bei Raumtemperatur ein gelbliches Öl ist. Bei 20 tiefen Temperaturen ist es wachsartig-kristallin.

Mikroanalyse (20 Stunden im Hochvakuum bei 50° getrocknet):
Berechnet für $C_{29}H_{49}N_1O_5$ (491,713): C 70,84, H 10,04, N 2,85
Gefunden: C 70,85, H 9,97, N 2,59

25

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -19,0^\circ$ (c = 1, in Chloroform).

Massenspektrum (chemische Ionisation mit NH_3 als Reagenzgas): Spitzen u.a. bei m/z 509 ($M+NH_4^+$) und 492 ($M+H^+$).

30

IR-Spektrum (Film): Banden u.a. bei 3318, 3012, 2928, 2558, 2745, 1823, 1740, 1673, 1521, 1382, 1370, 1250, 1191 cm^{-1} .

Beispiel 2

35

a) Fermentation:

Mit einer gemäss Beispiel 1 hergestellten Vorkultur von *Streptomyces toxytricini* 85-13 (Schüttelkolben und

dann 10 l-Fermentation) wird eine 200 l-Fermentation mit Produktionsmedium N 16 beimpft. Das Produktionsmedium N 16 entspricht dem in Beispiel 1 verwendeten Produktionsmedium N 7, enthält jedoch zusätzlich 0,1% Schweineschmalz. Die Fermentation wird während 120 Stunden wie in Beispiel 1 durchgeführt. Nach 120 Stunden beträgt die intrazelluläre lipasehemmende Aktivität 71 IC₅₀/ml, die extrazelluläre 4 IC₅₀/ml Gärbrühe.

10 b) Aufarbeitung:

Nach Beendigung der Fermentation wird die Gärbrühe 10 Minuten auf 80° erhitzt, anschliessend abgekühlt und die Zellmasse mittels einer Röhrenzentrifuge aufgetrennt. Durch zweimaliges Zentrifugieren erhält man 11,4 kg Mycel; das Kulturfiltrat wird verworfen. Das Mycel wird während 30 Minuten in 70 l Methanol verrührt, worauf man die erhaltene Suspension abnutsch. Der Filterkuchen wird nochmals mit 50 l Methanol verrührt und genutscht. Die vereinigten methanolischen Extrakte werden auf 1,8 l konzentriert. Dieses Konzentrat wird dreimal mit je 2 l Butylacetat extrahiert. Aus den vereinigten organischen Phasen erhält man nach dem Eindampfen 160 g Rohextrakt.

c) Reinigung:

25 Dieser Rohextrakt wird durch multiplikative Extraktion mit dem System Hexan/Methanol/Wasser (5:4:0,9) gereinigt. Zuerst wird die aktive Substanz von der unteren Phase (uP) in die obere Phase (oP) transferiert. 160 g Rohextrakt werden in 4 l uP gelöst und im Ausrührgefäss mit 4 l oP gerührt. Nach der Abtrennung der oP wird die uP ein zweites Mal mit 4 l frischer oP extrahiert. Es bildet sich eine stabile Emulsion, welcher noch je 4 l uP und oP zugegeben werden, worauf eine gute Phasentrennung erzielt wird. Nach der Abtrennung der oP wird die uP noch zweimal mit 8 l frischer oP extrahiert. Die vereinigten oP ergeben nach dem Eindampfen 90,3 g Extrakt. Die extrahierte uP wird verworfen. Nun wird die aktive Substanz von der oP in die uP transferiert. 90,3 g des obigen Extraktes werden

in 4 l oP gelöst und mit 4 l uP extrahiert. Nach der Phasentrennung wird die oP noch dreimal mit frischer uP extrahiert. Die oP wird anschliessend verworfen. Die vereinigten uP werden auf 0,7 l wässrige Phase konzentriert, und diese wird achtmal mit insgesamt 0,2 l Essigester extrahiert. Nach dem Eindampfen erhält man 25,8 g Produkt. Die extrahierte wässrige Phase wird verworfen. Die weitere Reinigung dieses Materials erfolgt durch Filtration über 1 kg Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm Korngrösse; Säule 10 x 100 cm) unter Eluieren mit Chloroform. Man erhält 649 mg Produkt, das an einer Lobar-Fertigsäule (Lichoprep RP-8, Grösse C) unter Eluieren mit Methanol chromatographiert wird (Reversed-Phase-Chromatographie). Man erhält 204 mg Lipstatin, das gemäss Dünnschichtchromatogramm rein ist.

Beispiel 3

Man löst 138 mg Lipstatin in 10 ml Aethanol, versetzt mit 60 mg 5-proz. Palladium/Kohle und rührt bei Raumtemperatur während 3 Stunden in einer Wasserstoffatmosphäre (Ballon). Anschliessend wird der Katalysator abzentrifugiert. Das Hydrierungsprodukt wird über eine kurze Kieselgelsäule (1 x 5 cm) mit Chloroform chromatographiert. Man erhält 112 mg N-Formylleucin 1-[(3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl)methyl]dodecanyl-ester (Tetrahydrolipstatin) als wachsartigen, schwach gelben Festkörper.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -32,0^\circ$ (c = 1, in Chloroform).

Massenspektrum (chemische Ionisation mit NH_3 als Reagenzgas): Spitzen u.a. bei m/z 513 ($\text{M}+\text{NH}_4^+$); 496 ($\text{M}+\text{H}^+$) und 452 ($\text{M}+\text{H}^+-\text{CO}_2$).

IR-Spektrum (Film): Banden u.a. bei 3332, 2956, 2921, 2853, 1838, 1731, 1709, 1665, 1524, 1383, 1249 und 1200 cm^{-1} .

¹H-NMR-Spektrum (270 MHz, CDCl₃): 0,89 (6H); 0,97 (6H); 1,15-1,5, 1,5-1,85 und 1,9-2,25 (3H); 3,24 (2H); 4,32 (3H); 4,68 (2H); 5,03 (1H); 6,43 (1H); 8,07 und 8,21 (1H) ppm.

5

Beispiel 4

a) Fermentation:

Eine 2 l-Schüttelkulturflasche mit Medium 391 wird mit Sporen einer Schrägagarkultur von *Streptomyces toxytricini* 85-13 beimpft und während 72 Stunden bei 28°C aerob inkubiert. Danach wird die 2 l-Vorkultur in einen 50 l-Fermenter mit Produktionsmedium N 16 übergeführt und bei 28°C während 77 Stunden mit 0,5 vvm Belüftung inkubiert. Diese 50 l-Vorkultur wird zur Beimpfung eines 1'000 l-Fermenters mit Medium N 16 verwendet. Diese Produktionsfermentation wird bei 28°C und 0,5 vvm Belüftung während 91 Stunden durchgeführt, wobei ein Lipstatin-Titer von 73 IC₅₀/ml intrazellulär und 16 IC₅₀/ml extrazellulär erreicht wird. Die ganze Gärbrühe wird auf 2°C gekühlt und zentrifugiert, wobei 41 kg feuchte Biomasse anfallen, die bei -20°C eingefroren werden.

b) Aufarbeitung:

37 kg Mycel werden bei 4°C aufgetaut und mit etwa 40 l Wasser in einem Mixer homogenisiert. Die erhaltene dünnflüssige Suspension wird mit 140 l Methanol versetzt und während 20 Minuten gerührt. Anschliessend wird über ein Filtertuch abgenutscht, worauf der Filterkuchen noch mit 140 l Methanol extrahiert wird. Die Methanolextrakte werden bei 30°C auf etwa 22 l konzentriert. Das erhaltene Konzentrat wird mit Wasser auf 50 l verdünnt und im Ausrührgefäss dreimal mit je 50 l Hexan/Essigester (1:1) extrahiert. Bei der zweiten und dritten Extraktion erhält man Emulsionen, die durch Zugabe von etwa 1,4 kg bzw. 0,5 kg Kochsalz gebrochen werden können. Die vereinigten organischen Extrakte werden konzentriert, über Natriumsulfat getrocknet und bis zum öligen Rückstand eingedampft. Man erhält 428 g Rohextrakt.

c) Reinigung:

Dieser Rohextrakt wird in vier Portionen über je 1 kg Kieselgel 60 (0,040 - 0,063 mm Korngrösse) filtriert, wobei man mit Chloroform eluiert (Säule: 10 x 100 cm).

- 5 Man erhält 70 g angereichertes Präparat, das in zwei Portionen über je 1 kg Kieselgel 60 unter Eluieren mit Hexan/Essigester (Gradient von 9:1 bis 4:1) filtriert wird. Man erhält 4,2 g aktives Material, das man in vier Portionen mittels Reversed-Phase-Chromatographie an einer
- 10 Lobar-Fertigsäule (Lichoprep RP-8, Grösse C) unter Eluieren mit Methanol reinigt. Man erhält 1,77 g Lipstatin.

Beispiel A

- 15 Herstellung von Weichgelatine kapseln folgender Zusammensetzung:

	<u>Menge pro Kapsel</u>
Lipstatin	50 mg
20 NEOBEE M-5	450 µl

Die Lösung des Wirkstoffes in NEOBEE M-5 wird in Weichgelatine kapseln geeigneter Grösse abgefüllt.

25

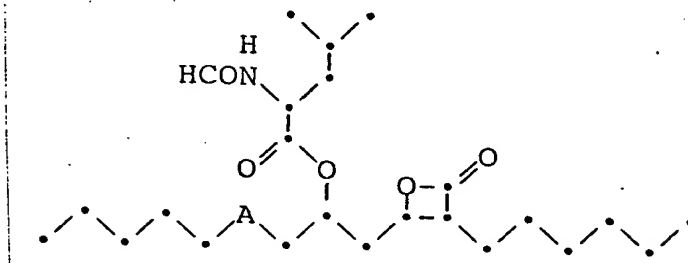
30

35

Patentansprüche

1. Eine Verbindung der allgemeinen Formel

5



I

10

worin A die Gruppe

oder $-(CH_2)_5-$

bedeutet.

15

2. N-Formylleucin 1-[(3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl)methyl]-3Z,6Z-dodecadienyl-ester.

3. N-Formylleucin 1-[(3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl)methyl]-20 dodecanyl-ester.

4. Eine Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3 als pharmazeutischer Wirkstoff.

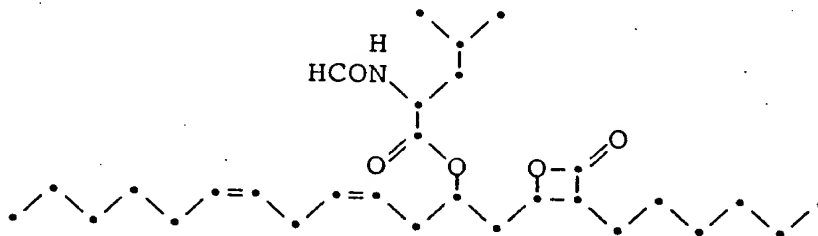
25 5. Eine Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3 als ein die Pankreaslipase hemmender Stoff.

6. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man

30

a) zur Herstellung von N-Formylleucin 1-[(3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl)methyl]-3Z,6Z-dodecadienyl-ester der Formel

35

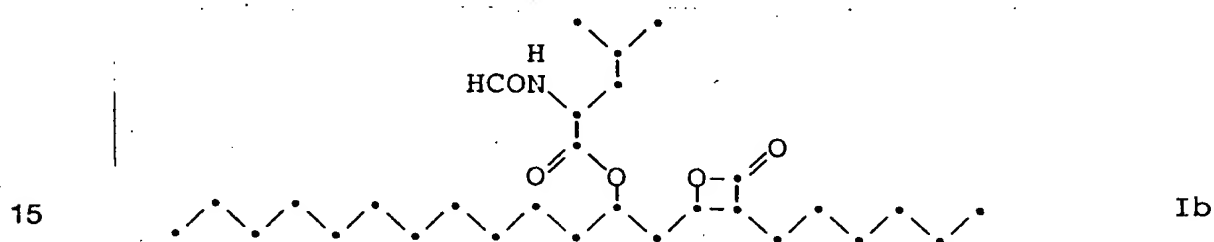


Ia

einen die Verbindung der Formel Ia produzierenden Microorganismus der Spezies *Streptomyces toxytricini* in einem wässrigen Kulturmedium, das geeignete Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und anorganische Salze enthält, aerob kultiviert und die produzierte Verbindung der Formel Ia aus der Kulturbrühe abtrennt, oder

b) zur Herstellung von N-Formylleucin 1-[(3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl)methyl]dodecanyl-ester der Formel

10



die Verbindung der Formel Ia hydriert.

7. Verfahren gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Microorganismus *Streptomyces toxytricini* NRRL 15443 oder die Verbindung der Formel Ia produzierende Subkulturen, Varianten oder Mutanten davon verwendet.

8. Arzneimittel, enthaltend eine Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3.

9. Arzneimittel gemäss Anspruch 8, welche die Pankreaslipase hemmen.

30

10. Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln gemäss Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3 und erwünschtenfalls eine oder mehrere andere therapeutisch wertvolle Stoffe in eine galenische Darreichungsform bringt.

11. Industriell gefertigte Lebensmittel, enthaltend eine Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3.

12. Verwendung einer Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3 bei der Herstellung von industriell gefertigten Lebensmitteln.

13. Verwendung einer Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3 bei der Bekämpfung oder Verhütung von Krankheiten.

10

14. Verwendung einer Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3 bei der Bekämpfung oder Verhütung von Obesitas und Hyperlipämien.

15

15. Eine Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3, sofern nach dem Verfahren gemäss Anspruch 6 oder 7 oder nach einem dazu äquivalenten Verfahren hergestellt.

20

16. Die Erfindung wie sie hiervor beschrieben wird.

25

30

35